

ANNÉE 1925

THÈSE

N°

516

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PRÉSENTÉE PAR

PIERRE DUCOU

de la Faculté de Médecine de Paris

Diplômé de l'Institut de Médecine Légale et de Psychiatrie

Médaille d'honneur des Epidémies

Né le 11 Février 1898, à Port-Sainte-Foy (Dordogne)

CONSIDÉRATIONS

SUR LA

MÉTHÉMOGLOBINE

Son Dosage dans le Sang

Président : M. BALTHAZARD, *Professeur*

PARIS

AMÉDÉE LEGRAND, ÉDITEUR

93, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 93

1925

THÈSE
POUR
LE DOCTORAT EN MÉDECINE

ANNÉE 1925

THÈSE

N° _____

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PRÉSENTÉE PAR

PIERRE DUCOU

de la Faculté de Médecine de Paris

Diplômé de l'Institut de Médecine Légale et de Psychiatrie

Médaille d'honneur des Epidémies

Né, le 11 Février 1898, à Port-Sainte-Foy (Dordogne)

CONSIDÉRATIONS

SUR LA

MÉTHÉMOGLOBINE

Son Dosage dans le Sang

Président : M. BALTHAZARD, Professeur

PARIS

AMÉDÉE LEGRAND, ÉDITEUR

93, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 93

1925

I. — PROFESSEURS

MM.

Anatomie.	NICOLAS
Anatomie médico-chirurgicale.	CUNÉO.
Physiologie.	Ch. RICHET.
Physique médicale.	André BROCA.
Chimie organique et chimie générale.	DESGREZ.
Bactériologie.	BEZANÇON.
Parasitologie et histoire naturelle médicale.	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales.	Marcel LABBÉ.
Pathologie médicale.	SICARD.
Pathologie chirurgicale.	LECENE.
Anatomie pathologique.	LETULLE.
Histologie.	PRENANT.
Pharmacologie et matière médicale.	RICHAUD.
Thérapeutique.	CARNOT.
Hygiène.	Léon BERNARD.
Médecine légale.	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie.	MÉNÉTRIÉR.
Pathologie expérimentale et comparée.	ROGER.
Clinique médicale.	GILBERT.
	CHAUFFARD.
	ACHARD
	WIDAL.
Hygiène et clinique de la première enfance.	MARFAN.
Clinique des maladies des enfants.	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.	JEANSELME.
Clinique des maladies du système nerveux.	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses.	TEISSIER.
	DELBET.
Clinique chirurgicale.	HARTMANN.
	LEJARS.
	GOSSET.
Clinique ophtalmologique.	De LAPERSONNE
Clinique urologique.	LEGUEU.
Clinique d'accouchements.	COUVELAIRE.
	BRINDEAU.
	JEANNIN.
Clinique gynécologique.	J.-L. FAURE.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie.	BROCA Auguste.
Clinique thérapeutique médicale.	VAQUEZ.
Clinique oto-rhino-laryngologique.	SEBILEAU.
Clinique thérapeutique chirurgicale.	DUVAL.
Clinique propédeutique.	SERGENT.

II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.		MM.	
ABRAMI	Pathologie médicale	LABBÉ (Henri). . .	Chimie biologique.
ALGLAVE	Pathologie chirurgi- cale	LARDENNOIS. . . .	Pathologie chirurgi- cale.
AUBERTIN	Pathologie médicale	LE LORIER.	Obstétrique.
BASSET.	Pathologie chirurgi- cale.	LEMAITRE.	Oto-rhino-laryngolo- gie.
BAUDOUIN	Pathologie médicale.	LEMIERRE.	Pathologie médicale.
BINET	Physiologie.	LÉVY SOLAL.	Obstétrique
BLANCHETIERE.	Chimie biologique.	LHERMITTE.	Pathologie mentale.
BRANCA	Histologie.	LIAN	Pathologie médicale.
BRULÉ	Pathologie médicale.	MATHIEU.	Pathologie chirurgi- cale.
BUSQUET.	Pharmacologie et ma- tière médicale.	METZGER.	Obstétrique.
CADENAT	Pathologie chirurgi- cale	MOCQUOT.	Pathologie chirurgi- cale.
CHAMPY.	Histologie.	MONDOR.	Pathologie chirurgi- cale
CHIRAY.	Pathologie médicale	MOÛRE.	Pathologie chirurgi- cale.
CLERC.	Pathologie médicale.	MULON.	Histologie
DEBRÉ.	Hygiène	PHILIBERT.	Bactériologie.
I. de JONG	Anatomie pathologi- que.	RIBIERRE	Pathologie médicale.
DUVOIR	Médecine légale.	RICHTER Fils. . . .	Physiologie.
ÉCALLE	Obstétrique.	ROUVIÈRE.	Anatomie.
FIESSINGER	Pathologie médicale	STROHL	Physique médicale.
FOIX.	Pathologie médicale.	TANON.	Pathologie médicale.
GARNIER.	Pathologie expéri- mentale.	TIFFENEAU	Pharmacologie et ma- tière médicale.
HARVIER.	Pathologie médicale.	VAUDESCAL.	Obstétrique
HEITZ-BOYER. . .	Urologie.	VERNE.	Histologie.
HOVELACQUE. . .	Anatomie.	VILLARET.	Pathologie médicale.
JOYEUX	Parasitologie.	WELTER	Ophthalmologie.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE

pour le service des examens

MM.		MM.	
CAMUS.	Physiologie.	RETTERER.	Histologie.
GOUGEROT.	Pathologie médicale.	ROUSSY	Anatomie pathologi- que.
GUÉNIOT.	Obstétrique.		

VI. — AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE

à titre permanent

MM.		MM	
AUVRAY	Clinique chirurgicale.	OMBRÉDANNE. . .	Clinique chirurgicale infantile.
CHEVASSU. . . .	Clinique chirurgicale.	PROUST	Clinique chirurgicale.
LAIGNEL-LAVASTINE. .	Clinique médicale.	RATHERY	Clinique médicale.
LEREBG-JLLET. . .	Clinique médicale infantile.	SCHWARTZ	Clinique chirurgicale.
LÉRI.	Clinique médicale.	TERRIEN.	Clinique ophtalmologique.
LOEPER.	Clinique médicale.		

V. — CHARGÉS DE COURS

MM. MAUCLAIRE, agrégé.	}	Chargé du cours de chirurgie orthopédique chez l'adulte pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes adultes.
FREY		Stomatologie.
N...		Éducation physique.
LEDoux-LEBARD		Radiologie clinique.

Par délibération en date du 9 Décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MA FEMME

A LA MÉMOIRE DE MA GRAND'MÈRE

ELISABETH DUCOU

A MON GRAND-PÈRE S. DUCOU

*Témoignage de reconnaissance filiale
pour toute la sollicitude dont ils
m'ont entouré.*

A MA MÈRE, A MON PÈRE

A TOUS LES MEMBRES DE MA FAMILLE

A MON MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR V. BALTHAZARD

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

DIRECTEUR DE L'INSTITUT MÉDICO-LÉGAL

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

*Qui m'a guidé dans ce travail et m'a
fait le grand honneur d'accepter la
présidence de ma thèse.*

*Qu'il veuille bien trouver ici l'expres-
sion de mes sentiments reconnais-
sants, ainsi que l'assurance de mon
attachement respectueux.*

A NOTRE COUSIN

LE PROFESSEUR F. LAGRANGE

PROFESSEUR D'OPHTALMOLOGIE A LA FACULTÉ
DE MÉDECINE DE BORDEAUX

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'INSTITUT

MEMBRE ASSOCIÉ NATIONAL DE L'ACADÉMIE
DE MÉDECINE

COMMANDEUR DE LA LÉGION D'HONNEUR

A MES MÉDECINS CHEFS DANS LA MARINE

M. LE DOCTEUR FOUCAULT

MÉDECIN EN CHEF DE PREMIÈRE CLASSE DE LA MARINE
EX-MÉDECIN CHEF DE L'HÔPITAL MARITIME
DE ROCHEFORT
COMMANDEUR DE LA LÉGION D'HONNEUR

M. LE DOCTEUR BARRAT

MÉDECIN GÉNÉRAL DE DEUXIÈME CLASSE DE LA MARINE
DIRECTEUR DE L'ÉCOLE ANNEXE DE SANTÉ NAVALE
DE ROCHEFORT
COMMANDEUR DE LA LÉGION D'HONNEUR

M. LE DOCTEUR E. AUDIAT

MÉDECIN GÉNÉRAL DE DEUXIÈME CLASSE DE LA MARINE
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

A MES MAITRES DANS LES HOPITAUX DE PARIS

A MES MAITRES-

DE L'INSTITUT DE MÉDECINE LÉGALE ET DE PSYCHIATRIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

AUX DOCTEURS :

R. P. PIÉDELIÈVRE, CHEF DE LABORATOIRE
DE MÉDECINE LÉGALE

PHILIPPE, PRÉPARATEUR DU COURS DE MÉDECINE
LÉGALE A LA FACULTÉ DE PARIS

Sentiments les plus cordiaux.

Sommaire

INTRODUCTION.

I. CHAPITRE PREMIER :

La Méthémoglobine. Les conditions de sa production « in vitro » et dans l'organisme. Agents méthémoglobinisants chimiques. Agents méthémoglobinisants physiques.

II. CHAPITRE DEUXIÈME :

La préparation de la méthémoglobine. Méthémoglobine cristallisée et méthémoglobine en solution. *Constitution chimique de la méthémoglobine.* LA MÉTHÉMOGLOBINE EST UN SOUS-OXYDE D'HÉMOGLOBINE.

III. CHAPITRE TROISIÈME :

Principales propriétés physiques et chimiques de la méthémoglobine.

Dosage de la méthémoglobine dans le Sang.

Exposé de la technique du dosage chimique.
Procédé de Nicloux.

Exposé de la technique du dosage physico-chimique. PROCÉDÉ SPECTROMÉTRIQUE DE BALTHAZARD.

IV. CHAPITRE QUATRIÈME :

Expérimentation personnelle. Action méthémoglobinémiqne de divers agents chimiques sur le cobaye et le chien. — Résultats de quelques dosages de la méthémoglobine dans le sang par la méthode spectrométrique (Procédé Balthazard).

Discussion et interprétation des résultats expérimentaux.

V. CHAPITRE CINQUIÈME :

Avantages que présente la méthode spectrométrique de dosage de la méthémoglobine dans le sang.

Son intérêt et ses applications en médecine : en Toxicologie clinique et médico-légale.

Conclusions.

Introduction

HOPPE-SEYLER, le premier, en 1864, constata la présence de méthémoglobine dans le sang. Il la considéra comme le produit de la décomposition spontanée de l'oxyhémoglobine au contact de l'air et, lui attribuant une individualité chimique bien définie, il lui donna, en 1865, le nom de méthémoglobine, nom qui lui est resté depuis. Cet auteur cependant ne tarda pas à concevoir des doutes sur la réalité de ce nouveau pigment sanguin. Persuadé qu'il avait commis une erreur d'identification, il déclara que ce qu'il avait décrit sous le nom de méthémoglobine n'était, en réalité, que de l'hématine maintenue en dissolution par un peu d'oxyhémoglobine non décomposée, ou d'albumine.

Quelques années plus tard, A. GAMGEE, au cours d'examens et de recherches spectroscopiques effectués sur le sang d'animaux morts empoisonnés par le nitrite d'amyle, constata à son tour la présence du pigment dont Hoppe-Seyler, ne voulait plus admettre l'existence.

L'incertitude régnait toujours sur la méthémoglobine lorsque, en 1868, PREYER prit sa défense et fit paraître sur ce pigment un certain nombre de tra-

vaux qui réussirent à faire accepter à peu près par tous les auteurs, que la méthémoglobine était un individu chimique bien défini.

A partir de 1876, l'étude de la méthémoglobine jusque là restée dans l'ombre, passe à l'ordre du jour et suscite de nombreux travaux tant en France qu'à l'étranger. En 1888, H. BERTIN-SANS lui consacre sa thèse inaugurale. Pour la première fois alors toute la question de la méthémoglobine est rigoureusement examinée, expérimentalement critiquée et judicieusement mise au point. 1870

L'année suivante, HAYEM, lui accorde une place importante dans son traité « Du Sang ». Il étudie sa formation dans l'organisme et établit une classification des agents chimiques qui lui donnent naissance, classification à laquelle les travaux récents n'ont, en somme, que peu ajouté. L'étude approfondie de la méthémoglobine lui paraît du plus haut intérêt en médecine et il fonde sur elle de grands espoirs. Malheureusement, faute d'une technique de recherche pratique et précise, ces espérances ne se sont pas réalisées ; — elles n'en demeurent pas moins toujours possibles.

La méthémoglobine en effet, il faut bien le reconnaître, n'occupe plus, à l'heure actuelle, dans les Traités Spéciaux, le piédestal sur lequel Hayem s'était complu à la placer. Pour s'en convaincre, il suffit d'ouvrir les traités classiques d'Hématologie de BEZANÇON et de LABBÉ, ou plus près de nous encore celui de GILBERT et WEINBERG (1921).

Parmi les auteurs qui ont étudié la méthémoglobine il convient de citer LAMBLING qui consacra deux études à ce pigment, l'une parue dans l'« Encyclopédie chimique de Frémy », en 1895, et l'autre publiée en 1902 dans le dictionnaire de Würtz. Avec HÜFNER, cet auteur admet que la méthémoglobine contient la même quantité d'oxygène que l'oxyhémoglobine, mais fixée d'une autre façon et *beaucoup plus stable*. Cette opinion prévalut contre celle d'Hoppe-Seyler, de MARCHAND, de WEYL, d'ANREP, de HENNINGER qui voyaient dans la méthémoglobine un sous-oxyde d'hémoglobine. Celle de SORBY et de JÄDERHOLM qui pensaient que ce pigment était un peroxyde d'hémoglobine, tomba elle aussi rapidement dans le discrédit.

En 1906, E. DERRIEN, dans sa thèse « Sur la Méthémoglobine » se rallie à l'opinion d'Hüfner et de Lambling. Cette opinion depuis est devenue classique. Il fut convenu de considérer la Méthémoglobine comme *un isomère de l'oxyhémoglobine*. La longue controverse sur la nature chimique de ce pigment paraissait donc définitivement close, lorsque tout récemment, deux auteurs anglais, ROAF et SMART, ont essayé de démontrer que la méthémoglobine, loin de renfermer la même quantité d'oxygène que l'oxyhémoglobine, n'en possédait que la moitié.

NICLOUX et ROCHE se sont ralliés à cette opinion, à l'appui de laquelle ils ont produit des arguments d'ordre expérimental, qui paraissent irréfutables.

Lorsqu'on parcourt l'ensemble de la littérature concernant la Méthémoglobine, on reste surpris de constater combien grande est la confusion qui règne dans tout ce qui a trait à ce pigment. Les opinions les plus contradictoires s'y trouvent émises tant sur le nombre, la nature des agents méthémoglobinisants et les conditions dans lesquelles ils agissent que sur la préparation, la nature et les propriétés physiques et chimiques de la Méthémoglobine elle-même.

Si donc, la transformation de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine sous l'action d'agents les plus divers est un fait bien connu, il n'en demeure pas moins vrai que l'étude plus approfondie de ce pigment du sang reste toujours fort incomplète.

Nous montrerons qu'à l'heure actuelle, grâce aux travaux récents, la question si controversée de la constitution chimique du pigment est élucidée quant à sa teneur en oxygène. Nous nous proposons également d'indiquer comment on peut doser la méthémoglobine dans le sang, par un procédé physico-chimique, concurremment à celui qui a été donné par Nicloux, procédé purement chimique.

CHAPITRE I

La Méthémoglobine. — Conditions de sa Formation. — Agents méthémoglobinisants

« On donne le nom d'agents méthémoglobini-
« sants aux substances chimiques, aux formes de
« l'énergie et aux conditions physiques ou physio-
« logiques sous l'influence desquelles la matière co-
« lorante du sang se transforme en méthémoglo-
bine ». E. DERRIEN.

Leur nombre déjà grand à l'époque où H. Bertin-
Sans les étudia n'a fait qu'augmenter depuis. Vu
leur grande diversité il est bien difficile d'en donner
une classification méthodique et complète.

Nous les diviserons en deux grands groupes :
les agents chimiques et les agents physiques.

1° AGENTS CHIMIQUES

Leur nombre est considérable ; aussi, loin de nous
la pensée d'entrer dans l'étude détaillée de chacun
d'entre eux, étude qui nous entraînerait beaucoup
trop loin, hors des limites étroites de ce travail.

Dittrich le premier, essaya d'en donner une classification en les groupant d'après leurs propriétés chimiques. Il distingua les agents méthémoglobinisants *oxydants*, les agents méthémoglobinisants *réducteurs* et ceux qui ne sont ni l'un ni l'autre. Cette classification est, comme on le voit, illusoire, puisque des corps qui ne sont ni oxydants ni réducteurs, peuvent néanmoins avoir une action méthémoglobinisante sur le sang.

Cette classification artificielle, très élastique, est par suite entièrement à rejeter.

Peu satisfait lui-même de cette classification Dittrich essaya finalement de grouper les substances méthémoglobinisantes d'après la rapidité d'apparition sous leur influence de la méthémoglobine dans le sang. Dans ce nouveau tableau nous relevons que la *saccharase* et la *glycérine* donnent après 24 heures, à une température de 38°, la bande d'absorption dans le rouge de la méthémoglobine. Nous sommes intimement persuadé que la température indiquée, en présence de l'oxygène de l'air, suffit à elle seule à réaliser cette transformation dans un semblable laps de temps. Cette nouvelle classification laisse donc encore beaucoup à désirer.

L'agent méthémoglobinisant type « *in vitro* » est sans aucun doute le *ferricyanure de potassium* ; il est sans action par contre « *in vivo* ».

Le *ferrocyanure de potassium* auquel Dittrich attribue une action méthémoglobinisante rapide est, au contraire, comme l'a signalé Hüfner et comme

nous l'avons constaté nous-mêmes, *aussi bien inactif « in vivo » que « in vitro »*.

Les nitrites (nitrite de sodium, nitrite d'amyle, vapeurs rutilantes d'acide azotique) ont une action méthémoglobinisante sur le sang, mais cette action est complexe, car l'on voit également apparaître de l'*hémoglobine bioxyazotée*. Dans sa thèse, A. von Vorkampff-Laue signale l'action méthémoglobinisante de l'alcool. L'alcool ne saurait avoir une action méthémoglobinisante par lui-même, mais il empêche la putréfaction dans le sang et c'est ce qui permet à l'hémoglobine de se transformer en *méthémoglobine* au contact de l'air. Cette propriété a été utilisée par Nicloux pour la préparation de la méthémoglobine en solution.

Lapicque et Vast ont constaté la formation de méthémoglobine dans le sang des chiens soumis à l'action de la *Toluyène-diamine*.

Nous citerons encore parmi les agents chimiques méthémoglobinisants l'*aniline* et ses dérivés à fonction-Amine, les *Composés phénotiques* dont la liste est aussi longue que variée. Ces divers produits agissent assez rapidement sur l'oxyhémoglobine dissoute dans l'eau, par contre, leur action sur les globules rouges est variable. Aussi longtemps que les globules rouges sont intacts, il n'y aurait pas, d'après von Mering, production de méthémoglobine, celle-ci ne commencerait à apparaître que *lorsque les globules sont détruits*.

L'action de ces agents présente donc un tableau différent selon qu'on étudie leur action « in vitro » ou dans l'organisme. Sur ce dernier point l'accord parmi les auteurs est loin d'être complet.

Hayem a divisé en deux classes les substances qui provoquent la formation de méthémoglobine dans l'organisme.

1° Celles qui transforment l'oxyhémoglobine en méthémoglobine dans l'intérieur même des globules sans les détruire.

2° Celles qui exercent sur eux une action *hémolytique*.

Cette dernière classe se divise en trois groupes :

Le premier de ces groupes comprend les substances qui dissolvent un certain nombre de globules et transforment en méthémoglobine l'oxyhémoglobine dissoute, comme aussi celle qui se trouve dans les globules restés intacts.

Le second groupe comprend les substances qui sont sans action nuisible à petite dose car elles agissent lentement et sont éliminées avant d'avoir pu produire des effets sensibles ; à dose moyenne, elles dissolvent les globules, provoquent l'apparition de méthémoglobine dans le plasma, enfin à dose élevée, elles produisent la formation de méthémoglobine au sein même des hématies.

Quant aux substances du troisième groupe elles n'attaquent pas les globules, ne déterminent pas l'apparition de méthémoglobine globulaire et ne

peuvent transformer que l'oxyhémoglobine dissoute.

2° AGENTS PHYSIQUES

La *chaleur* possède une action méthémoglobinisante très *nette* sur l'oxyhémoglobine. Cette influence a été tout d'abord signalée par Dittrich et reconnue depuis par tous les auteurs. Ville et Derrien reprenant les expériences de Dittrich à ce sujet, expériences qui n'étaient pas à l'abri de quelques critiques au point de vue de l'asepsie, trouvèrent que, pour des échantillons de sang dilué, rigoureusement à l'abri de tout microbe et placés à une température de 38°, la bande 634 de la méthémoglobine apparaissait déjà après trente-six heures pour devenir très nette à partir de quarante-huit heures, tandis que le sang témoin laissé dans le laboratoire à une température oscillant autour de 18° ne commençait à présenter une faible absorption dans le rouge qu'à partir de quatre jours seulement. Menzies expérimenta tantôt à la température du laboratoire, tantôt au bain-marie à 38° et à 40° et trouva que dans ce dernier cas la transformation était beaucoup plus rapide. Nicloux signale lui aussi la chaleur comme étant un agent méthémoglobinisant très actif.

Le *laquage* est également reconnu comme réalisant une condition favorable à la production de méthémoglobine. Von Mering et Hayem ont vu que le pigment du globule rouge résiste mieux aux agents

méthémoglobinisants que l'oxyhémoglobine libérée du complexe globulaire. On connaît à ce propos la classification de Hayem et les lois que cet auteur a données sur la formation de la méthémoglobine dans l'organisme.

CHAPITRE II

La Préparation de la Méthémoglobine. — Méthémoglobine cristallisée et Méthémoglobine en Solution. — La Constitution chimique de la Méthémoglobine.

PRÉPARATION DE LA MÉTHÉMOGLOBINE

I. Méthémoglobine cristallisée :

Il est très difficile de conserver à l'état cristallisé de l'oxyhémoglobine en présence de l'air sans voir apparaître de la méthémoglobine ; c'est ainsi que d'anciennes préparations d'oxyhémoglobine se transforment peu à peu en méthémoglobine. Les cristaux d'oxyhémoglobine préparés selon la méthode de Hoppe-Seyler sont eux-mêmes au bout d'un temps suffisant complètement transformés en méthémoglobine et peuvent servir comme tels dans les recherches.

Hüfner et ses collaborateurs, méthémoglobinaient l'oxyhémoglobine avec le *ferricyanure de potassium*, qui, comme on le sait, est l'agent chimique

méthémoglobinisant type « in vitro », puis ils utilisaient l'action de l'alcool et du froid pour amener la cristallisation de la solution ainsi obtenue. Von Zeyneck procédait par simple refroidissement en partant de solutions très *concentrées* sans addition d'alcool.

Dittrich, Ville, Derrien remplacent, dans la préparation, l'alcool par le *sulfate ammonique*.

Quel que soit le mode de préparation utilisé on ne peut *jamais obtenir des cristaux de méthémoglobine chimiquement pure*.

Méthémoglobine en solution :

La préparation de la méthémoglobine en solution est délicate quand on veut l'obtenir exempte des réactifs qui lui ont donné naissance et éviter les processus putréfactifs qui la transforment en hémoglobine.

Grâce à Nicloux nous pouvons à l'heure actuelle obtenir par une méthode de préparation simple et facile, des solutions de méthémoglobine stables et identiques à elles-mêmes. Cet auteur, au cours d'un travail sur le dosage de l'oxyde de carbone dans l'air par la méthode au sang, avait déjà signalé que le sang de bœuf, défibriné, additionné d'un dixième de son volume d'alcool à 95° devient *imputrescible* et que l'hémoglobine se transforme au bout d'un certain temps et progressivement en méthémoglobine. Cette transformation, lente à la température ordinaire du laboratoire, est accélérée par l'élévation

de la température. Cette constatation n'a rien de surprenant puisque nous connaissons bien l'action méthémoglobinisante de la chaleur. En une semaine, dit Nicloux, cette transformation est à peu près totale à l'étuve à 37°, au contraire il faut six semaines environ à la température ordinaire du laboratoire, pour arriver au même résultat. Le sang maintenu autant que possible au contact d'oxygène pur se laque puis change de teinte, abandonnant sa teinte rouge vermeil pour devenir brun, brun foncé, brun chocolat et arriver enfin à la couleur *sépia* caractéristique de la méthémoglobine. On ne constate pas la moindre odeur de putréfaction et le pigment, déclare Nicloux, reste toujours limpide ; il ne se forme jamais le moindre dépôt.

La méthémoglobine ainsi obtenue n'est pas absolument pure, elle renferme toujours une certaine proportion d'oxy-hémoglobine. Cette proportion n'a jamais pu descendre au-dessous de 4 %, correspondant à 96 % de méthémoglobine.

L'énorme avantage qu'a l'alcool de rendre le sang imputrescible et ainsi d'empêcher le retour de la méthémoglobine à l'hémoglobine par les processus réducteurs de la putréfaction rend possible de ce fait, la manipulation de solutions de méthémoglobine toujours identiques entre elles dans un milieu comparable au sang lui-même.

Suivant le milieu dans lequel on considère la méthémoglobine il y a lieu de distinguer : la *méthémoglobine neutre ou légèrement acide* et la *méthémoglobine alcaline*. Il convient aussi de citer la *méthémoglobine fluorée*, pigment qui a été l'objet d'une étude approfondie de Ville et de Derrien.

En 1895, Menzies avait déjà remarqué que des extraits aqueux de tissus spléniques auxquels il avait ajouté du *fluorure de sodium* pour les conserver, avaient changé de couleur. Le liquide était d'un rouge cramoisi et, au spectroscope, présentait deux nouvelles bandes d'absorption à 612 et à 500. Les deux bandes de l'oxy-hémoglobine étaient presque effacées. Menzies obtint le même spectre en traitant des solutions d'oxy-hémoglobine cristallisée par le fluorure de sodium. L'addition d'un peu d'acide acétique augmentait l'intensité de la bande dans l'orangé et faisait disparaître les bandes de l'oxy-hémoglobine. Menzies remarqua enfin que la bande qu'il venait de découvrir occupait une position voisine de celle de l'hématine, mais qu'elle s'en distinguait et par son intensité (*extremely pronounced*) et par l'action des réducteurs.

La bande qui apparaît sous l'action des fluorures à 612 a été appelée : *bande de Menzies* par Ville et Derrien. Menzies attribuait ces nouvelles apparences spectrales à une espèce de méthémoglobine, « into a form of methaemoglobin » formée au détriment de l'oxy-hémoglobine par le fluorure de sodium.

Piettre et Villa signalèrent que la bande d'absorption de la méthémoglobine dans le rouge à 634 se déplaçait à 512 sous l'influence du fluorure de sodium. Enfin Ville et Derrien reprirent de leur côté l'étude de la méthémoglobine soumise à l'action du fluorure de sodium et ils remarquèrent que, lorsqu'à une solution de méthémoglobine ou de sang méthémoglobinisé on ajoute une petite quantité d'une solution récente de fluorure de sodium pur, on constate que la bande dans le rouge, la plus foncée et la plus nette du spectre de la méthémoglobine disparaît pour faire place à une nouvelle bande beaucoup *plus intense*, située à droite de la précédente (l'extrémité du spectre étant à gauche). Le milieu de cette bande se trouverait être, d'après ces auteurs, vers 612, alors que l'axe de la bande dans le rouge de la méthémoglobine est située à 633. Ville et Derrien, en traitant la méthémoglobine en solution, par le fluorure de sodium, obtinrent d'une façon *immédiate*, les apparences spectrales qui ne s'étaient manifestées qu'à la longue dans les extraits spléniques et les solutions d'oxyhémoglobine observées par Menzies.

Derrien fait remarquer dans sa thèse, que le spectre d'absorption signalé par cet auteur n'est pas dû à l'action du fluorure de sodium sur l'*oxyhémoglobine*, comme Menzies le pensait, mais bien sur la méthémoglobine qui, nous le savons, en dérive si facilement. C'est ce qui explique également pour-

quoi le phénomène devenait plus net en ajoutant un peu d'acide acétique.

Ville et Derrien attirèrent l'attention sur ce fait que l'addition de fluorure de sodium dans une solution contenant une très faible quantité de méthémoglobine *fait tout de suite* apparaître la bande de Menzies. Cette bande, possédant un caractère de visibilité des plus nets, permet ainsi de déceler l'existence de la méthémoglobine dans le sang à des doses trop minimes pour pouvoir être constatées à l'examen spectroscopique direct.

CONSTITUTION CHIMIQUE DE LA MÉTHÉMOGLOBINE

On a beaucoup discuté sur les relations de composition qui existent entre la méthémoglobine et l'oxyhémoglobine. Dans les expériences qui firent l'objet de toutes ces discussions, le problème resta purement spectroscopique. Il s'agissait de constater si, dans la transformation de la méthémoglobine en hémoglobine par l'action des réducteurs on peut remarquer ou non l'apparition transitoire du spectre de l'oxyhémoglobine. On ne saurait retracer ici les expériences extrêmement nombreuses qui ont été faites à ce sujet et à la suite desquelles la méthémoglobine a été considérée soit comme produit d'oxydation de l'hémoglobine, moins élevé que l'oxyhémoglobine tel que le prétendaient Hoppe-Seyler, Marchand, Weyl, Anrep, Henninger, soit au

contraire comme un peroxyde d'hémoglobine comme l'affirmait Sorby et Jäderholm. Ce dernier avait obtenu de l'oxyhémoglobine par réduction modérée de la méthémoglobine, mais ses expériences furent mises en doute par divers auteurs.

Hüfner et ses élèves prétendaient que la méthémoglobine renferme sensiblement la même quantité d'oxygène que l'oxyhémoglobine, mais fixée d'une autre façon et beaucoup plus stable.

Haldane trancha le différend en déclarant que la formation d'oxyhémoglobine signalée par Sorby et Jäderholm était due à la présence d'oxygène dissous dans les liquides d'expérience.

Donc, pour nous résumer, trois opinions sur la constitution chimique de la méthémoglobine ont été successivement émises :

1° *La méthémoglobine est un sous-oxyle d'hémoglobine.*

2° *La méthémoglobine est un peroxyde d'hémoglobine.*

3° *La méthémoglobine est un isomère de l'oxyhémoglobine.*

A l'opinion d'Hüfner se sont ralliés Lambling et la plupart des auteurs contemporains. Lambling déclara la controverse terminée, malgré ajouta-t-il, les critiques dont sont encore passibles les déterminations des proportions d'oxygène contenues dans ce pigment sanguin.

Des travaux anglais récents viennent de remettre la question en discussion en prétendant démontrer que la méthémoglobine, loin de renfermer la même quantité d'oxygène que l'oxyhémoglobine, n'en contient que la moitié.

ACTION DES RÉDUCTEURS SUR LA MÉTHÉMOGLOBINE

Lorsqu'on soumet une solution de méthémoglobine à l'action d'un *réducteur suffisamment énergique*, il se produit *toujours de l'hémoglobine*. Ainsi donc nous voyons que les réducteurs agissent sur la méthémoglobine comme sur l'oxyhémoglobine en aboutissant à l'hémoglobine.

Mais si, au lieu de se servir de réducteurs énergiques on utilise un *réducteur modéré voire même faible*, on constate alors que l'on transforme la méthémoglobine en oxyhémoglobine. Pour bien réussir cette réduction, il faut employer le *réactif de Stokes* modifié par Ville et Derrien, après l'avoir dilué de *trois fois son volume d'eau* (1).

Voici comment on procède :

1° On remplit une petite cuve pour examen spectroscopique d'une solution au 100° de méthémoglobine.

2° On ajoute *une goutte par centimètre cube* de la dilution du réactif de Ville et Derrien préparée au

(1) *Réactif de Ville et Derrien :*

Sulfate ferreux cristallisé	1 gr.
Acide tartrique cristallisé	2 gr.
Eau distillée	20 cm ³
Ammoniaque :	q. s. p. alcaliniser

(conserver en ampoules fermées à la lampe).

moment de l'usage, en utilisant des ampoules fermées à la lampe.

Immédiatement la méthémoglobine est transformée en oxyhémoglobine comme on peut le constater au spectroscope.

Le même résultat s'obtient en partant de la *méthémoglobine alcaline ou légèrement acide*. On peut aussi réduire de la même façon la *méthémoglobine fluorée*, mais cette réduction est lente et toujours partielle d'autant plus qu'il existe dans la solution un plus grand excès de fluorure de sodium. Nous soulignerons l'intérêt pratique qui découle de ces faits, en indiquant qu'ils sont utilisés pour une nouvelle méthode de dosage de la méthémoglobine dans le sang, *méthode spectrométrique*.

De l'ensemble de ces constatations il nous est apparu que la méthémoglobine, sauf à l'égard du vide, de CO et de Az, n'est pas une forme d'hémoglobine oxygénée plus stable que l'oxyhémoglobine. L'expérience suivante le démontre clairement.

Prenons deux solutions, une de méthémoglobine et une d'oxyhémoglobine de même concentration. Ajoutons une goutte de réactif de Ville et Derrien par centimètre cube à chacune de ces solutions. La méthémoglobine se transforme en oxyhémoglobine ; quant à l'oxyhémoglobine, elle ne présente aucune modification.

LA MÉTHÉMOGLOBINE EST DONC PLUS SENSIBLE A L'ACTION DES RÉDUCTEURS FAIBLES QUE L'OXYHÉMO-

GLOBINE TOUT AU MOINS « IN VITRO » ET EN PRÉSENCE
DE L'OXYGÈNE ATMOSPHERIQUE.

Mais pour exacte qu'elle soit la transformation de la méthémoglobine en oxyhémoglobine, sous l'influence des réducteurs faibles, ne renseigne pas d'une façon précise sur la teneur en oxygène de la méthémoglobine. Il est possible en effet que, réduite à l'état d'hémoglobine, la méthémoglobine donne immédiatement naissance, comme l'avait soutenu Haldane, à l'oxyhémoglobine par oxydation du pigment formé aux dépens de l'oxygène dissous dans le liquide.

En opérant dans le vide la réduction de la méthémoglobine, Balthazard et Philippe avaient cru pouvoir conclure à la formation d'oxyhémoglobine.

Mais des expériences plus rigoureuses, poursuivies en extrayant à l'aide de la pompe de Gaiffe, à la température de 40°, la totalité de l'oxygène en solution dans le liquide, ont prouvé que la réduction de la méthémoglobine s'opère toujours à l'état d'hémoglobine.

Opérant avec des solutions concentrées de méthémoglobine, Nicloux exerce une réduction modérée et dose la quantité d'oxygène de l'oxyhémoglobine formée. Dans une première expérience, il ajoute une quantité d'hydrosulfite de soude en solution ammoniacale, suffisante pour enlever, 0 cc 16 d'oxygène à la méthémoglobine. Si la méthémoglobine s'était transformée en oxyhémoglobine, il devrait être possible d'enlever, dans les conditions de l'ex-

périence, 1 cc 28 d'oxygène à cette oxyhémoglobine. Or il n'est possible d'extraire que 0 cc 038, quantité qui correspond à l'oxygène dissous dans la solution.

Dans une seconde expérience, Nicloux ajoute une quantité de réducteur calculée exactement pour détruire toute la méthémoglobine ; on devrait alors pouvoir extraire de l'oxyhémoglobine formée 1 cc 73 d'oxygène, alors que l'expérience ne permet d'en extraire que 0 cc 084.

Il est donc prouvé que la méthémoglobine, par réduction massive ou modérée, se transforme en hémoglobine, sans passer par le stade intermédiaire oxyhémoglobine.

Les faits invoqués au début de ce chapitre, à savoir, la transformation dans les solutions diluées de la méthémoglobine en oxyhémoglobine, s'expliquent par l'avidité de l'hémoglobine pour l'oxygène, ce pigment se transformant immédiatement en oxyhémoglobine, tant qu'il reste de l'oxygène en solution dans le liquide.

Il est d'ailleurs assez curieux de constater que le réducteur, ajouté en quantité modérée à la solution de méthémoglobine, agit uniquement sur le pigment, sans toucher à l'oxygène dissous, sans toucher à l'oxygène de l'oxyhémoglobine ; il en est ainsi lorsqu'on ajoute des doses croissantes de réactif réducteur à un mélange de méthémoglobine et d'oxyhémoglobine, alors même qu'il existe un excès d'oxygène en solution, tant qu'il

subsiste de la méthémoglobine. L'oxygène dissous n'est fixé par le réducteur, l'oxyhémoglobine n'est réduite que lorsque la méthémoglobine a été totalement détruite.

LA MÉTHÉMOGLOBINE RENFERME DEUX FOIS MOINS D'OXYGÈNE QUE L'OXYHÉMOGLOBINE.

Nicloux et Roche ont établi le fait suivant : toutes les fois qu'en enlevant un volume V d'oxygène à la méthémoglobine, on modifie ce pigment, le pigment nouveau peut fixer le volume $2 V$ d'oxyde de carbone.

Balthazard et Philippe ont vérifié l'exactitude de cette conclusion en dosant la méthémoglobine par le procédé spectrométrique que nous décrivons plus loin. La méthémoglobine diluée au dixième, après préparation par le procédé de Nicloux, est additionnée du réactif hydrosulfite de soude en quantité modérée. On ajoute :

RÉACTIF	QUANTITÉ D'OXYGÈNE ENLEVÉE	QUANTITÉ DE C O FIXÉE
0cc,12	0cc,0266	0cc,05098
0cc,24	0cc,0532	0cc,1046

Le rapport du volume d'oxyde de carbone fixé au volume d'oxygène enlevé, est donc dans le premier cas de 1,89, dans le second cas de 1,96, valeurs suffisamment voisines de 2, en tenant compte des erreurs inévitables d'expérience.

L'expérience donne les mêmes résultats que l'on opère sous une couche protectrice d'huile de vaseline, ou au contact de l'air.

Il est donc établi que la méthémoglobine n'est pas un isomère de l'oxyhémoglobine, auquel cas sa réduction aboutirait à une fixation d'oxyde de carbone volume à volume avec l'oxygène enlevé.

Balthazard et Philippe ont montré que l'expérience donnerait les mêmes résultats, si la méthémoglobine était soit un peroxyde d'hémoglobine de formule Hb O^3 , soit un sous-oxyde de formule Hb O . Dans le premier cas, la réduction donnerait Hb O^2 dans le second cas Hb capables de fixer le même volume d'oxyde de carbone, double du volume d'oxygène soustrait.

Mais les expériences rapportées plus haut démontrant que la réduction de la méthémoglobine donne toujours naissance à de l'hémoglobine, il en résulte QUE LA MÉTHÉMOGLOBINE CONTIENT DEUX FOIS MOINS D'OXYGÈNE QUE L'OXYHÉMOGLOBINE.

CHAPITRE III

Principales propriétés de la Méthémoglobine.

Propriétés chimiques. — Propriétés physiques (Propriétés spectroscopiques). — Le Dosage dans le Sang de la Méthémoglobine :

- a) Procédé de Nieloux.
- b) Procédé de Balthazard.

Exposé des Différentes techniques

PROPRIÉTÉS CHIMIQUES DE LA MÉTHÉMOGLOBINE

La méthémoglobine neutre ou légèrement acide, en solution assez concentrée, présente une coloration brun chocolat tout à fait caractéristique. Sur les sujets fortement méthémoglobinisés on voit paraître une teinte bistre au niveau des conjonctives et des muqueuses ; chez le cobaye la même teinte apparaît au niveau des capillaires du pavillon de l'oreille, par transparence.

La méthémoglobine alcaline a une coloration nettement différente. Elle est de teinte rougeâtre, rappelant un peu celle de l'oxyhémoglobine. Les solu-

tions de méthémoglobine fluorée, observées à l'état concentré, sont, dit Derrien, d'un rouge grenat, un peu vert, rappelant assez bien la coloration du dessous des feuilles de certains bégonias. Les solutions diluées présentent cette coloration à la lumière réfléchie et sont verdâtres à la lumière transmise.

La principale propriété chimique de la méthémoglobine, quel que soit l'état sous lequel on l'étudie, est de ne pas céder son oxygène sous l'action du vide, même si ce dernier est poussé très loin. Comme autre propriété chimique importante de la méthémoglobine il faut aussi signaler celle qu'a ce pigment de ne pas se combiner à l'oxyde de carbone.

Cette propriété est connue depuis longtemps. Bertin-Sans et Moitessier, en 1891, montrèrent que le ferri-cyanure de potassium, réagissant sur l'hémoglobine oxycarbonée, la transforme en méthémoglobine ordinaire en libérant de l'oxyde de carbone et non, comme l'ont pensé Weyl et Anrep en méthémoglobine oxycarbonée. L'oxyde de carbone devenu libre reste physiologiquement dissous dans le liquide. Si l'on fait agir ensuite un réducteur fort, la méthémoglobine est transformée en hémoglobine, mais si l'on agite alors la dissolution ce n'est pas l'oxygène qui est fixé mais l'oxyde de carbone resté dans la dissolution. C'est donc le spectre de l'hémoglobine oxycarbonée que l'on voit réapparaître.

Nieloux, de son côté, déclare : « nous avons mis
« pendant des heures de la méthémoglobine au
« contact de l'oxyde de carbone en agitant énergi-
« quement. *Nous n'avons jamais pu constater de*
« fixation ».

ACTION DES RÉDUCTEURS SUR LA MÉTHÉMOGLOBINE

Les réducteurs à action énergique transforment la méthémoglobine en hémoglobine. Les réducteurs à action modérée ramènent très facilement la méthémoglobine à l'état d'oxyhémoglobine grâce à la combinaison immédiate de l'hémoglobine formée avec l'oxygène dissous ou avec l'oxygène de l'air, comme nous l'avons indiqué dans le chapitre précédent. Nous rappelons que pour bien réussir cette réduction il faut utiliser le réactif de Stokes modifié par Ville et Derrien, dilué de trois fois son volume d'eau. Le même résultat s'observe aussi bien avec la *méthémoglobine alcaline qu'avec la méthémoglobine neutre ou légèrement acide et la méthémoglobine fluorée*. Mais comme nous l'avons signalé pour la méthémoglobine fluorée, la réduction est lente à se produire et elle est toujours partielle, d'autant plus qu'il existe dans la solution un plus grand excès de fluorure de sodium.

L'hydrosulfite de soude en solution ammoniacale légère est un réducteur énergique qu'il est nécessaire de manier avec beaucoup de précautions pour observer la formation d'oxyhémoglobine, sinon la

réduction est complète et la bande de Stokes apparaît rapidement.

Le sulfate de protoxyde de fer détermine l'apparition des bandes de l'oxyhémoglobine, mais ce réducteur peu puissant n'exerce qu'une action réductrice toujours partielle sur la méthémoglobine et avec lui, on n'observe jamais l'apparition d'hémoglobine, au moins en opérant au contact de l'air.

L'hydrogène sulfureux transforme la méthémoglobine en un mélange d'oxyhémoglobine et d'hémoglobine, plus tardivement l'oxyhémoglobine est transformée elle-même en hémoglobine.

Le sulphydrate d'ammoniaque, donne une réduction plus rapide, mais il se fait toujours une petite quantité de sulfhémoglobine caractérisée par une bande dans le rouge dont le maximum d'intensité répond à la longueur d'onde $\lambda = 624$.

On pouvait se demander si l'addition d'alcali à la méthémoglobine neutre ou légèrement acide n'entraînait pas, à elle seule, une transformation partielle en oxyhémoglobine. En effet, le spectre de la méthémoglobine alcaline comporte deux bandes foncées dont le maximum d'intensité correspond aux longueurs d'ondes : $\lambda = 577$ et $\lambda = 539$, les mêmes que pour l'oxyhémoglobine. L'agitation avec l'oxyde de carbone enlève toute hésitation : on constate en effet que les bandes $\lambda = 577$ et $\lambda = 539$ ne changent pas de place vers la droite et que par suite

il n'existe pas d'oxyhémoglobine dans la solution de méthémoglobine alcaline.

LE DOSAGE DE LA MÉTHÉMOGLOBINE DANS LE SANG

Nicloux, récemment, a donné un bon procédé de dosage de la méthémoglobine en présence ou non d'oxyhémoglobine.

Jusque là, le dosage de la méthémoglobine n'avait été qu'à peine esquissé. Au point de vue purement historique nous signalerons les tentatives faites par Hüfner et Otto ainsi que celles de H. Bertin-Sans et de Denning. Ce dernier auteur étudiant l'action méthémoglobinisante de certains médicaments sur divers animaux et voulant doser la méthémoglobine formée dans le sang de ces derniers, utilisa la spectrométrie en se servant des tableaux donnés par Hüfner.

Tout dernièrement, un certain nombre de *méthodes colorimétriques* ont été indiquées en Amérique en vue de l'application clinique du dosage de la méthémoglobine dans le sang. Mais le contrôle n'a pas été fait à partir de solutions renfermant des quantités connues de méthémoglobine, aussi, comme le fait justement remarquer Nicloux, ces méthodes ne peuvent donner que des résultats essentiellement comparatifs.

DOSAGE DE LA MÉTHÉMOGLOBINE EN PRÉSENCE OU NON
D'OXYHÉMOGLOBINE PAR LE PROCÉDÉ DE NICLOUX

PRINCIPE DU DOSAGE :

Il repose sur les propriétés suivantes de la méthémoglobine :

1° *La méthémoglobine ne se combine pas à l'oxyde de carbone.*

2° *La méthémoglobine, traitée par un réducteur (hydrosulfite de sodium en solution légèrement ammoniacale en excès) se transforme intégralement en hémoglobine et ce dernier pigment, agité au contact de l'oxyde de carbone se transforme à son tour en hémoglobine oxycarbonée.*

Par suite, lorsque l'on veut déterminer dans un mélange des deux pigments oxyhémoglobine et méthémoglobine, la proportion relative de chacun d'entr'eux, il suffit de procéder très simplement de la façon suivante :

De l'échantillon à analyser on prélèvera deux parties égales (10 à 20 cm³). La première est agitée avec de l'oxyde de carbone pur, la quantité d'oxyde de carbone fixé est proportionnelle à la quantité d'oxyhémoglobine, elle la mesure ; nous désignerons par a cette quantité.

La seconde partie est traitée en présence de l'oxyde de carbone par de l'hydrosulfite de sodium en solution ammoniacale. La méthémoglobine comme

l'oxyhémoglobine est réduite et les deux pigments passent successivement et *intégralement* à l'état d'hémoglobine d'abord, d'hémoglobine oxycarbonée ensuite. La quantité d'oxyde de carbone fixée, mesure la totalité des deux pigments. Nous désignons par *b* cette quantité.

Connaissant l'oxyhémoglobine *a* et la somme des deux pigments oxyhémoglobine et méthémoglobine : *b*, la méthémoglobine est évidemment égale à : *b* — *a*.

On aura donc :

$$\text{Proportion d'oxyhémoglobine p. 100 : } \frac{a}{b} \times 100$$

$$\text{Proportion de méthémoglobine p. 100 : } \frac{b - a}{b} \times 100.$$

★
★

DOSAGE PHYSICO-CHIMIQUE DE LA MÉTHÉMOGLOBINE DANS LE SANG PAR LE PROCÉDÉ BALTHAZARD

Pour effectuer ce dosage il n'est besoin que d'une seule goutte de sang. C'est un *microdosage* reposant sur les propriétés suivantes de la méthémoglobine :

1° La méthémoglobine ne se combine pas à l'oxyde de carbone.

2° La méthémoglobine ne subit aucune modification dans le vide à la température de 40°.

3° *La méthémoglobine est ramenée à l'état d'oxyhémoglobine par l'action modérée des réducteurs en présence de l'air* (Réactif de Stokes, modifié par Ville et Derrien).

Si donc on dilue au centième une goutte de sang renfermant une certaine proportion de méthémoglobine, après saturation de ce sang par l'oxyde de carbone, on obtiendra un mélange de méthémoglobine et d'hémoglobine oxycarbonée. En réduisant la méthémoglobine à l'état d'oxyhémoglobine on aboutit à un mélange d'oxyhémoglobine et de carboxyhémoglobine, dans lequel la proportion de cette dernière substance par rapport à la quantité totale d'hémoglobine constituant le coefficient d'empoisonnement : C, peut être dosé spectrométriquement.

100 — C représente la proportion de méthémoglobine contenue dans le sang examiné, par rapport à l'hémoglobine totale.

TECHNIQUE DU DOSAGE DE LA MÉTHÉMOGLOBINE PAR LA MÉTHODE SPECTROMÉTRIQUE

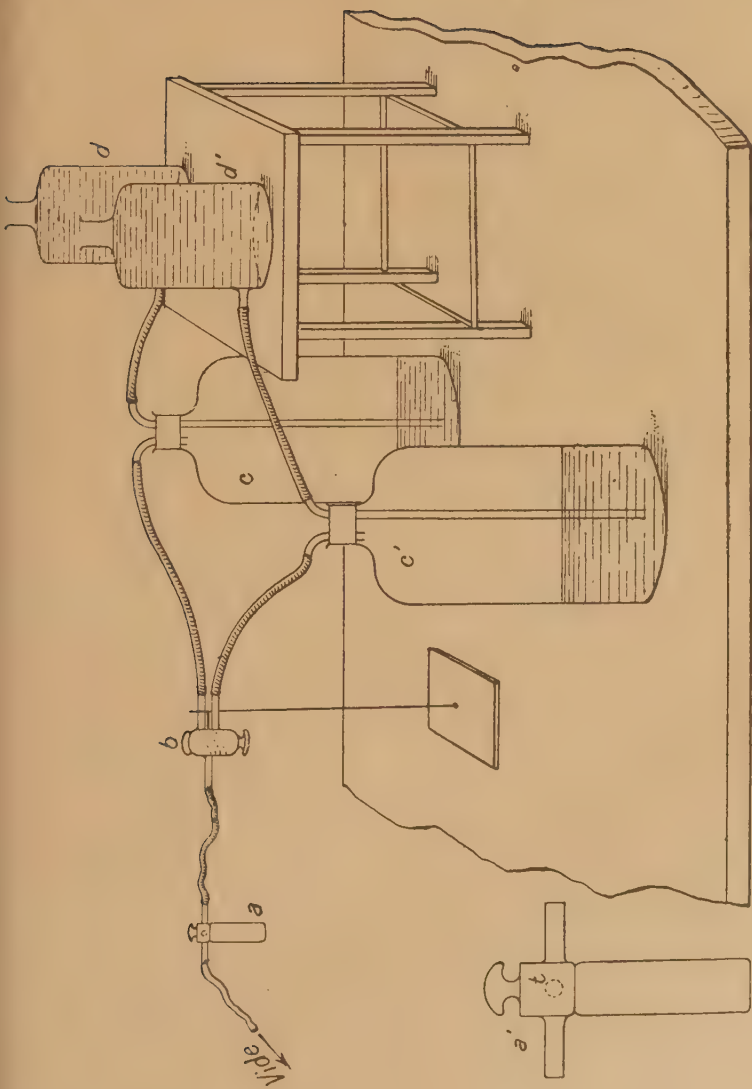
On prend une goutte de sang méthémoglobinémi-
que, on la dilue dans un centimètre cube d'eau,
puis la dilution ainsi obtenue est placée dans un pe-
tit flacon spécial *a* dont on trouvera le schéma dans
la planche ci-contre.

Par l'une des tubulures, on fait le vide après
avoir placé l'orifice *t* du bouchon-robinet *a'* face à la

tubulure. Le vide est poussé jusqu'à deux millimètres de mercure, le flacon *a* étant plongé dans de l'eau à la température de 40° après avoir fait tourner le bouchon-robinet de 180° , on fait rentrer dans le flacon de l'oxyde de carbone pur ; on agite, et l'on obtient ainsi très rapidement la saturation par l'oxyde de carbone de l'hémoglobine contenue dans la solution. Avant de procéder à la réduction de la méthémoglobine pour aboutir au mélange d'oxyhémoglobine et de carboxyhémoglobine, il est indispensable de débarrasser la solution de l'excès d'oxyde de carbone dissous, sans quoi l'oxyhémoglobine formée serait transformée en carboxyhémoglobine au fur et à mesure de sa production. On y parvient grâce au vide, que l'on renouvelle à deux ou trois reprises après avoir fait pénétrer de l'azote dans le flacon.

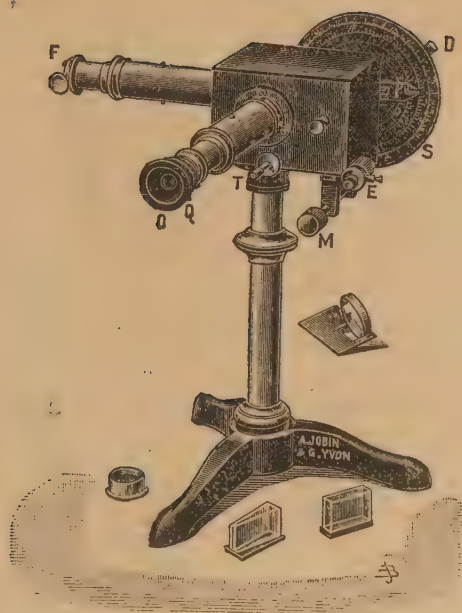
Après une dernière rentrée d'azote, le contenu du flacon est versé dans une petite cuve, à faces parallèles, d'un centimètre d'épaisseur et examinée au spectromètre. On voit alors la bande de la méthémoglobine, dont le maximum d'intensité correspond à la longueur d'onde $\lambda = 633$ et les deux bandes de la carboxyhémoglobine, celle de gauche ayant son maximum pour $\lambda = 570$.

On ajoute au contenu de la cuve une goutte de réactif de Ville et Derrien provenant d'une ampoule scellée à la lampe et diluée au tiers. Immédiatement la bande de la méthémoglobine pâlit, puis disparaît, tandis que la bande qui était à 570 se dé-



Dispositif utilisé pour le dosage de la Méthémoglobine

- a* Petit flacon spécial destiné à recevoir la dilution sanguine dans laquelle on veut doser la Méthémoglobine.
- b* Robinet à trois voies permettant l'admission alternative de l'oxyde de carbone et de l'azote dans le flacon *a*.
- c* Flacon contenant l'oxyde de carbone.
- c'* Flacon contenant l'azote.
- d* Flacon rempli d'eau. Cette eau en s'écoulant dans le flacon *c*, déplace l'oxyde de carbone.
- d'* Flacon rempli d'eau, qui sert à déplacer l'azote du flacon *c'*.
- a'* Bouchon-robinet du flacon *a*.
- f* Orifice du bouchon-robinet.



Hémo-spectromètre du Pr Balthazard

- M. E. Molette de transmission à la spirale graduée.
- S. Spirale graduée en unités λ
- D. Vis permettant le réglage de l'appareil.
- T. Tube support.
- Q. Tube porte-oculaire.
- O. Oculaire.
- F. Fente réglable.

place *vers la gauche*. On note la longueur d'onde correspondant au maximum d'intensité de cette bande dans sa nouvelle position, d'où l'on déduit la teneur de la solution en hémoglobine oxycarbonée. Par différence on obtient la teneur en oxyhémoglobine. Cette teneur correspond à la teneur initiale du sang en méthémoglobine.

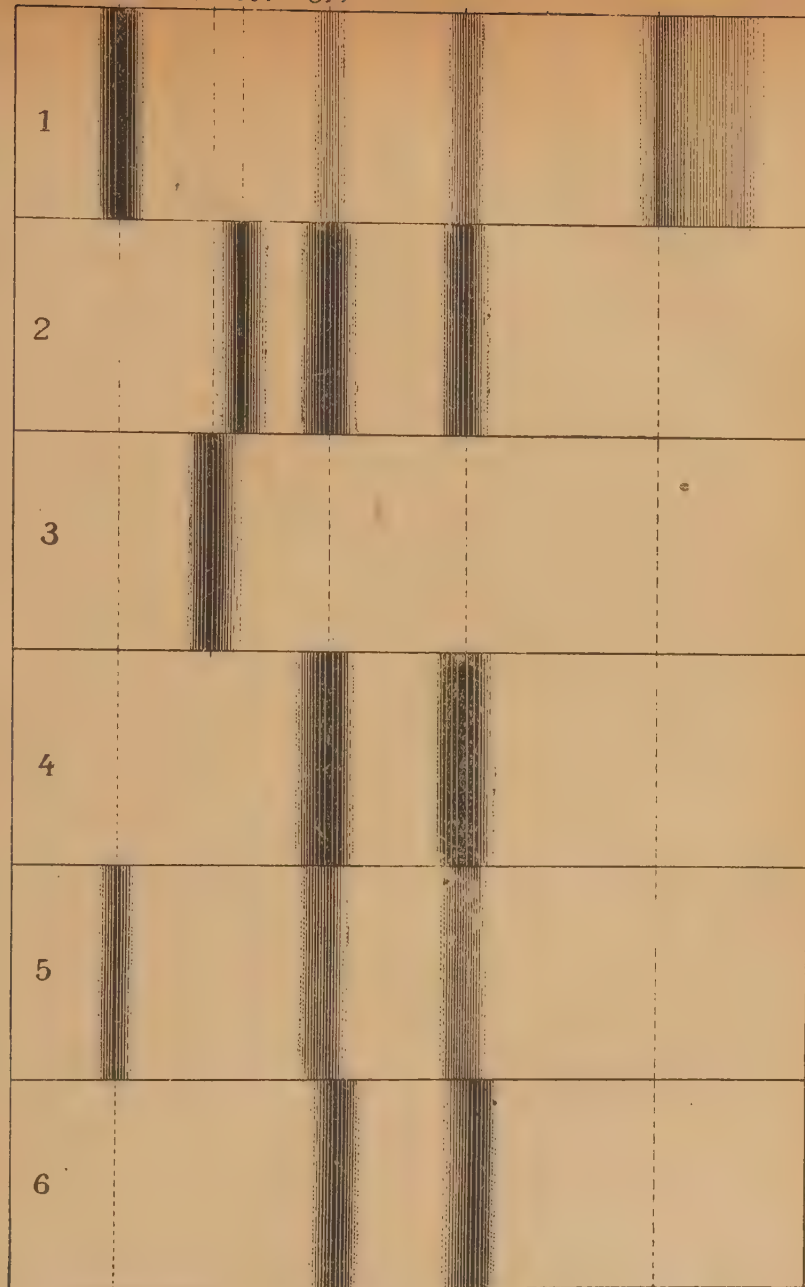
• APPAREILLAGE :

Un dispositif spécial permet la rentrée dans le flacon de gaz strictement privé d'oxygène par agitation prolongée avec une solution sodique d'hydrosulfite de soude ; l'azote et l'oxyde de carbone sont contenus dans deux flacons *c* et *c'* d'où ils sont déplacés par écoulement d'eau dans les dits flacons. Les deux flacons *c* et *c'* sont reliés à un robinet à trois tubulures *b*, la troisième tubulure étant elle-même jointe au petit flacon *a* dans lequel est placée la solution sanguine soumise à l'analyse (1).

CONTROLE PAR LE DOSAGE SPECTROMÉTRIQUE D'UN MÉLANGE DE MÉTHÉMOGLOBINE ET D'OXYHÉMOGLOBINE

Les deux solutions ont une concentration telle en méthémoglobine et en oxyhémoglobine que le mélange à parties égales renferme 53 % de méthémoglobine. Il est alors possible de calculer d'avance les proportions de méthémoglobine qui existeront dans des mélanges à proportions variées. Le tableau suivant donne les valeurs calculées et les valeurs trouvées par le dosage spectrométrique :

(1) Se reporter à la planche page 46.



572

- 1 Méthémoglobine acide.
- 2 — alcaline.
- 3 — fluorée.
- 4 Oxyhémoglobine.
- 5 Mélange méthémoglobine-carboxyhémoglobine.
- 6 — oxyhémoglobine-carboxyhémoglobine.



A : solution de *méthémoglobine* préparée d'après la méthode de Nicloux.

B : solution d'*oxyémoglobine*,

MÉLANGE	λ	VALEUR CALCULÉE	VALEUR TROUVÉE
A+B (parties égales)	573,0	0,53	0,53
1/4 A+B	570,8	0,81	0,82
1/3 A+B	571,0	0,77	0,78
1/2 A+B	571,8	0,69	0,68
2/3 A+B	572,0	0,63	0,66
3/4 A+B	572,6	0,59	0,57

Les erreurs ne dépassant pas *cinq pour cent*, les résultats sont donc satisfaisants.

CHAPITRE IV

Expérimentations personnelles sur le Cobaye et sur le Chien. — Dosage de la Méthémoglobine dans le Sang en utilisant la Méthode Spectrométrique. — Résultats obtenus. — Discussion. — Interprétation.

Nous nous sommes proposé de faire quelques dosages de la méthémoglobine dans le sang en utilisant la méthode spectrométrique, dont nous avons exposé la technique dans le précédent chapitre.

N'ayant besoin que d'une quantité de sang extrêmement petite puisque ce dosage est un *microdosage* et n'exige qu'une seule goutte de sang, nous avons tout naturellement choisi le cobaye comme sujet d'expérience.

Nous avons tour à tour essayé sur lui, l'action de divers agents chimiques réputés méthémoglobinisants. Ces substances ont été pour la plupart injectées en solution au cobaye par la voie hypodermique à des titres que nous indiquerons pour chacune des expériences. Disons tout de suite que nombreuses

furent nos déceptions au sujet des résultats obtenus ! Bien des produits chimiques signalés comme producteurs très fidèles de méthémoglobine dans le sang, ne donnèrent aucun résultat, tout au moins dans les conditions de nos expériences.

DIPHÉNYLAMINE.

Dose injectée : 0 gramme 20, en solution, par la voie sous-cutanée.

Cobaye pesant 540 grammes.

Mort survenue au bout de six heures, *sans que jamais on ait pu déceler la moindre trace de méthémoglobine dans le sang.*

ACÉTANILIDE.

Dose injectée 0 gramme 20 en solution, par la voie sous-cutanée.

Cobaye pesant 600 grammes.

Mort survenue au bout de trois heures, *sans production de méthémoglobine dans le sang.*

MÉTHYLACÉTANILIDE.

En expérimentant avec la méthylacétanilide beaucoup plus soluble que l'acétanilide et en employant des doses progressivement croissantes, nous avons pu déterminer plus ou moins rapidement la mort du cobaye, *sans jamais toutefois constater la présence de méthémoglobine dans le sang.*

CHLORATE DE POTASSE.

Quelle que soit la dose injectée, *on ne parvient pas à méthémoglobiner le cobaye.*

CHLORHYDRATE DE TOLUYLÈNE-DIAMINE.

Dose injectée 0 gramme 50 en solution par la voie sous-cutanée.

Cobaye pesant 550 grammes.

Mort survenue en cinquante minutes.

A l'examen spectroscopique du sang *on ne constate pas la présence de méthémoglobine.*

HUILE D'ANILINE.

CHLORHYDRATE D'ANILINE. — Nous avons expérimenté l'huile d'aniline et le chlorhydrate d'aniline par la voie sous-cutanée ; quelle qu'ait été la dose injectée *le résultat fut toujours négatif.*

PYROGALLOL.

Même insuccès avec le pyrogallol dans nos expériences sur le cobaye.

Par contre, nous avons vu avec ce même corps, apparaître « in vitro » la méthémoglobine dans le sang dans un laps de temps relativement court (un quart d'heure environ).

Nous signalons ces faits sans pouvoir leur donner une explication. Faut-il y voir une résistance à la formation de méthémoglobine, particulière au

cobaye et due à un certain degré d'alcalinité du sang, comme semblent l'admettre certains auteurs?

Les *nitrites* pourtant nous ont paru avoir une action méthémoglobinisante très nette bien que complexe, sur l'oxyhémoglobine du cobaye, comme en témoignent les expériences suivantes.

NITRITE DE SODIUM. — Un centimètre cube d'une solution de nitrite de sodium, renfermant 0 gramme 25 de nitrite de sodium par centimètre cube, est injectée à un cobaye d'un poids de 925 grammes, par la voie sous-cutanée.

La mort se produit au bout de 40 minutes. Le dessous des pattes, le museau, les conjonctives et la face interne du pavillon des oreilles présentent une teinte bistre très accusée. A l'ouverture du corps de l'animal on constate une coloration brune des viscères, les poumons sont café au lait foncé. On prend du sang dans le cœur à la pipette ; ce sang est franchement couleur chocolat. A l'examen spectroscopique on constate la présence de méthémoglobine (Bande d'absorption dans le rouge. $\lambda = 633$).

A un second cobaye, une femelle gravide sur le point de mettre bas, pesant 1 kilogramme, on injecte sous la peau 1 cm³,5 de la même solution, soit environ 0 gramme 12 de *nitrite de sodium*. Au bout d'une demi-heure on prélève une microprise de sang à l'oreille de l'animal qui paraît dyspnéique et très mal à l'aise. Les muqueuses et les conjonctives ont une coloration bistre. On examine ce sang au spec-

troscope et l'on constate la présence de méthémoglobine.

Mort du cobaye une heure et demie après l'injection.

A l'ouverture de l'animal on constate la même coloration des viscères que celle que présentait le cobaye précédent. Le sang est également de teinte chocolat foncé, et à l'examen spectroscopique la bande d'absorption de la méthémoglobine est visible.

Dans le sang des fœtus on ne constate pas la présence de méthémoglobine. Cela tient vraisemblablement à ce que l'intoxication de la mère a été très rapide.

VAPEURS NITREUSES :

Un cobaye d'un poids de 600 grammes est placé sous une cloche de verre d'une contenance de 6 litres, puis on fait entrer des vapeurs rutilantes d'acide azotique.

Le cobaye meurt en 20 minutes. Le sang concentré donne la bande d'absorption de la méthémoglobine dans le rouge à 633.

Les nitrites sont donc de toute évidence des agents méthémoglobinisants, mais on ne saurait néanmoins les considérer comme des agents à action simple. Ils agissent sur l'oxyhémoglobine d'une façon complexe et forment indépendamment de la méthémoglobine, de l'azoryhémoglobine dont le

spectre d'absorption vient gêner considérablement la lecture des bandes de la méthémoglobine et de l'hémoglobine oxycarbonée et par suite entraîner de nombreuses causes d'erreur dans le dosage spectrométrique ; aussi nous avons dû abandonner cet agent chimique comme producteur de méthémoglobine, en vue des dosages que nous nous proposons d'effectuer.

A la suite des difficultés et des insuccès éprouvés chez le cobaye, nous avons pris finalement le chien comme sujet d'expérience. Voici quels ont été les résultats des dosages pratiqués avec le sang de cet animal soumis à l'action de la *méthyl-acétanilide*, de la *toluylène-diamine* et de l'*huile d'aniline*.

Expérience I

MÉTHYL-ACÉTANILIDE : 2 grammes.

A 10 h. 30, nous administrons au moyen de la sonde œsophagienne deux grammes de méthyl-acétanilide dissous dans environ 100 grammes d'eau distillée, à un chien de petite taille (fox-terrier) pesant 8 kilogrammes.

A 15 h. 30, le même jour, l'animal paraît très abattu. Il reste étendu, taciturne dans son coin. Nous faisons alors une microprise de sang à l'animal, au niveau de la veine marginale de l'oreille gauche. Nous examinons le sang au spectroscope et nous constatons la présence très nette de méthémoglobine.

Nous pratiquons aussitôt le dosage spectrométrique. Nous trouvons :

$\lambda = 573,1$ après réduction de la méthémoglobine.

Ce qui correspond à 52 % d'hémoglobine oxycarbonée.

La proportion de méthémoglobine est donc égale à la différence, soit :

$$100 - 52 = 48$$

Dans le sang examiné 48 % de l'oxyhémoglobine est transformée en méthémoglobine.

Le lendemain, à 16 heures, sur le même animal, nous pratiquons une nouvelle prise de sang. A l'examen spectroscopique, même après addition de fluorure de sodium, il n'est plus possible de déceler la moindre trace de méthémoglobine.

Quant à l'animal, il est redevenu joyeux, vigoureux et possède un excellent appétit. On ne supposerait jamais qu'il a été profondément intoxiqué la veille.

Expérience II

MÉTHYL-ACÉTANILIDE : 4 grammes.

Quatre jours plus tard, après avoir laissé reposer l'animal, nous faisons à 10 h. 30, absorber au chien, toujours au moyen de la sonde œsophagienne, quatre grammes de méthyl-acétanilide.

A 16 h. 30, le même jour, nous pratiquons l'examen spectroscopique du sang de l'animal, pris au niveau de la veine marginale de l'oreille droite, et

nous trouvons qu'il renferme de la méthémoglobine.

Nous effectuons alors le dosage spectrométrique et nous trouvons :

$\lambda = 573,9$ après réduction de la méthémoglobine.

Ce qui correspond à 44 % d'hémoglobine oxycarbonée. La proportion de méthémoglobine est donc égale à :

$$100 - 44 = 56$$

Dans le sang examiné 56 % de l'oxyhémoglobine est transformée en méthémoglobine.

A 16 heures, le lendemain, nous ne trouvons plus de méthémoglobine dans le sang. L'animal est bien portant, joyeux, d'excellent appétit.

Expérience III

MÉTHYL-ACÉTANILIDE : 6 grammes.

Huit jours après notre dosage, à 9 h. 30, nous faisons absorber au même chien, toujours au moyen de la sonde œsophagienne, 6 grammes de méthyl-acétanilide dissous dans environ 150 grammes d'eau. Par deux fois le chien vomit à 10 h. 30 et à 11 heures. Lorsque nous revenons l'après-midi au laboratoire, nous trouvons le chien couché, légèrement engourdi. Cet engourdissement paraît plus prononcé au niveau du train postérieur. Nous constatons chez l'animal, une légère parésie. Les muscles externes de la cuisse et de la patte ne répondent plus à la piqure modérée ; d'autre part, il existe

une légère titubation dans les mouvements circulaires. L'animal se tourne difficilement.

Une microprise de sang est faite au niveau de la veine marginale de l'oreille droite. Au spectroscope on trouve de la méthémoglobine dans le sang.

Nous effectuons le dosage.

Nous avons $\lambda = 571,2$ après réduction de la méthémoglobine. Ce qui correspond à : 75,2 % d'hémoglobine oxycarbonée.

La proportion de méthémoglobine est donc égale à :

$$100 - 75,2 = 24,8$$

Dans le sang examiné, 24,8 % de l'oxyhémoglobine est transformée en méthémoglobine.

Expérience IV

CHLORHYDRATE DE TOLUYLÈNE-DIAMINE : 0 gr. 40.

Nous laissons le chien se reposer une semaine. Nous examinons son sang, il ne contient pas de méthémoglobine. A 9 h. 30, nous lui injectons cinq centigrammes par kilogramme de poids, soit 0 gr. 40 d'une solution de chlorhydrate de toluylène-diamine. (Voie sous-cutanée). A 14 heures, nous examinons son sang au spectroscope et nous constatons la présence de méthémoglobine.

Nous effectuons alors le dosage spectrométrique.

Nous trouvons $\lambda = 570,6$ après réduction de la méthémoglobine.

Soit : 86 % d'hémoglobine oxycarbonée.

La proportion de méthémoglobine dans le sang est donc de :

$$100 - 86 = 14$$

Dans le sang examiné 14 % de l'oxyhémoglobine est transformée en méthémoglobine.

A 15 heures nous effectuons un nouveau dosage :

Nous trouvons :

$$\lambda = 570,7$$

après réduction de la méthémoglobine.

Soit : 84 % d'hémoglobine oxycarbonée.

La proportion de la méthémoglobine dans le sang est, par suite, égale à :

$$100 - 84 = 16$$

Dans le sang examiné 16 % de l'oxyhémoglobine est transformée en méthémoglobine.

Expérience V

HUILE D'ANILINE : 1 cm³ 1/2.

Nous laissons le chien se reposer quelques jours. Son sang ne contient plus de méthémoglobine. Nous administrons à l'animal 1 cm³ 1/2 d'huile d'aniline à 10 h. 30.

A 14 h. 30, l'animal paraît très abattu. Il reste couché sur le flanc et présente une forte dyspnée.

Nous lui prenons du sang que nous examinons au spectroscope et nous constatons la présence de la méthémoglobine.

Nous effectuons le dosage spectrométrique et trouvons :

$$\lambda = 570,9$$

Après réduction de la méthémoglobine.

Ce qui correspond à 80 % d'hémoglobine oxycarbonée.

La proportion de méthémoglobine est donc de :

$$100 - 80 = 20$$

Dans le sang examiné 20 % de l'oxyhémoglobine est transformée en méthémoglobine.

★★

D'après les expériences précédentes, on voit que l'acétanilide, administrée au chien par la voie digestive possède une action méthémoglobinisante *des plus marquée* sur l'oxyhémoglobine. Cette méthémoglobulinémie qui est allée jusqu'à déterminer une transformation de 56 % de la quantité totale de l'oxyhémoglobine du sang circulant, n'a produit l'apparition d'aucun symptôme consécutif grave d'anémie. L'animal, dès le lendemain de l'expérience avait entièrement retrouvé son appétit, sa vigueur et son entrain. En outre, on ne constatait plus trace de méthémoglobine dans son sang.

Nous sommes donc portés à conclure avec Lépine et Pouchet que l'action de l'acétanilide dans l'organisme se borne uniquement à une « saignée vir-

« tuelle et temporaire, portant exclusivement sur
« l'oxyhémoglobine ».

Les agents méthémoglobinisants types auraient donc une action en tous points semblables à celle de l'oxyde de carbone qui paralyse fonctionnellement pour un temps l'oxyhémoglobine du sang circulant. Elle entraînerait donc une anoxhémie comparable à celle de l'intoxication oxycarbonée.

D'ailleurs les expériences de Denning ont montré que *la mort survient lorsque la teneur en méthémoglobine atteint 66 %*, c'est-à-dire lorsque l'oxyhémoglobine disponible pour les besoins de l'hématose n'est plus que le tiers de la quantité normale. Or, les recherches de Balthazard et de Nicloux sur l'intoxication oxycarbonée montrent également que la mort survient lorsque le coefficient d'empoisonnement atteint 0,66, c'est-à-dire quand il existe dans le sang 66 % d'oxyhémoglobine transformée en *carbonyhémoglobine* et que, par suite, l'organisme ne dispose plus que du tiers de l'oxyhémoglobine normale.

CHAPITRE V

Avantages du Dosage spectrométrique de la Méthémoglobine dans le Sang. — Son Intérêt et ses Applications en Médecine, en Toxicologie clinique et médico-légale. — Conclusions.

La méthode spectrométrique de dosage de la méthémoglobine dans le sang est une méthode reposant sur des propriétés physico-chimiques rigoureusement démontrées. Elle donne des résultats satisfaisants. Sa technique est relativement simple et facile, le matériel qu'elle nécessite malgré le prix élevé du spectromètre, reste néanmoins à la portée de tout laboratoire moderne bien outillé.

Elle n'exige pour effectuer les dosages qu'une quantité absolument infime de sang : *une goutte*. C'est un micro-dosage. La faible quantité de sang nécessaire aux recherches, permet de répéter autant de fois qu'il est besoin les investigations sur l'animal et en particulier sur l'homme sans qu'il en résulte le moindre danger, ni inconvénient. On ne risque pas d'introduire des causes d'erreur par mo-

difications du milieu humoral, modifications dues aux spoliations de sang importantes si elles sont répétées (10 à 20 cent. cubes dans la méthode de Nicloux).

Enfin c'est une méthode de dosage rapide.

Nous demeurons intimement persuadé que grâce à cette méthode de dosage l'étude encore bien incomplète de la méthémoglobine va prendre un nouvel essor et reconquérir la place importante que quelques auteurs lui ont jadis accordée en hématologie. Par des dosages répétés, il sera facile en effet, de suivre la formation et d'étudier l'action de la méthémoglobine dans l'organisme.

Cette étude, quoiqu'en pensent certains, est loin d'être dépourvue de tout intérêt pratique pour la clinique. Nous rappellerons ce qu'écrivait à ce sujet Hayem, auteur dont l'autorité est grande en matière d'hématologie.

« De toutes les transformations de l'hémoglobine, la plus intéressante pour les médecins est certainement celle qui aboutit à la production de méthémoglobine. C'est la seule que l'on puisse rencontrer en dehors de tout empoisonnement, par le simple fait de l'emploi de médicaments prescrits à doses dites thérapeutiques, et comme le nombre de ces médicaments est relativement considérable et augmente chaque jour rapidement la question acquiert par là un grand intérêt pratique ».

Nous rapporterons également l'opinion de H. Bertin-Sans. Cet auteur, parlant de la méthémoglobine et de son étude, pense que celle-ci, lorsqu'elle sera suffisamment avancée « pourra éclairer « divers problèmes médicaux ».

Déjà d'après les constatations faites au cours de nos expériences, nous sommes en mesure de pouvoir indiquer la ligne de conduite à suivre en présence d'une intoxication par agents chimiques à action *purement et nettement* méthémoglobinisante, comme par exemple l'*acétanilide*, produit appelé encore « *antifébrine* » et qui est quelquefois employé en thérapeutique comme un antipyrétique.

Il faut :

1° Essayer de soustraire le plus rapidement possible l'organisme à l'action de l'agent méthémoglobinisant. Si l'absorption a été faite par la bouche, ce qui est en général le cas habituel, il faut administrer promptement un vomitif et pratiquer au besoin un lavage d'estomac.

2° Faire, toutes les fois que cela est possible, un dosage de la méthémoglobine dans le sang pour connaître la proportion d'oxyhémoglobine qui est transformée en méthémoglobine. On luttera enfin, contre l'abaissement de la capacité respiratoire résultant de la formation de ce pigment, par des *inhalations d'oxygène* et concurremment par des injections sous-cutanées de ce gaz ; traitement en somme identique à celui de l'intoxication par l'oxyde de carbone.

La saignée est inutile sinon nuisible, car, comme nous l'avons vu, l'action de l'acétanilide sur le sang se borne uniquement à « *une saignée virtuelle et temporaire* ». Il suffit donc, par un apport étranger d'oxygène, de permettre au malade d'attendre la récupération de son oxyhémoglobine momentanément inutilisable par suite de sa transformation en méthémoglobine. La méthémoglobine contenue dans le milieu vivant qu'est le globule rouge, revient à l'état d'oxyhémoglobine dans un laps de temps relativement court, comme nous l'avons vu précédemment au cours de nos expériences sur le chien.

En outre, si comme le veut von Mering et comme semble l'admettre Masoin, les alcalins ont une action antiméthémoglobinisante réelle, une thérapeutique dans ce sens pourrait être également appliquée.

On a signalé à plusieurs reprises des intoxications mortelles par méthémoglobinémie. Plusieurs dues au *chlorate de potasse*, d'autres à l'*acide pyrogallique*, à la *nitroglycérine*, à la *nitro-benzine*, à l'*aniline*, au *sous-nitrate de bismuth*.

Il y a lieu de faire tout de suite des réserves pour les *composés nitreux*, car nous savons que l'action de ces agents chimiques sur le sang est complexe. Sous leur action, il se fait à côté de la méthémo-

globine de l'hémoglobine bioxyazotée aussi impropre à la respiration et même *plus stable*, que la carboxyhémoglobine. La méthémoglobine déjà existant dans le sang se transforme peu à peu, sous l'influence des réactions intra-organiques en nouvelles quantités d'hémoglobine bioxyazotée. Celle-ci, atteignant alors une certaine proportion, provoque des phénomènes d'asphyxie très graves, la totalité de l'oxyhémoglobine devenant alors indisponible. Dans ces conditions, la mort se produit rapidement, comme nous l'avons constaté au cours de nos expériences sur le cobaye.

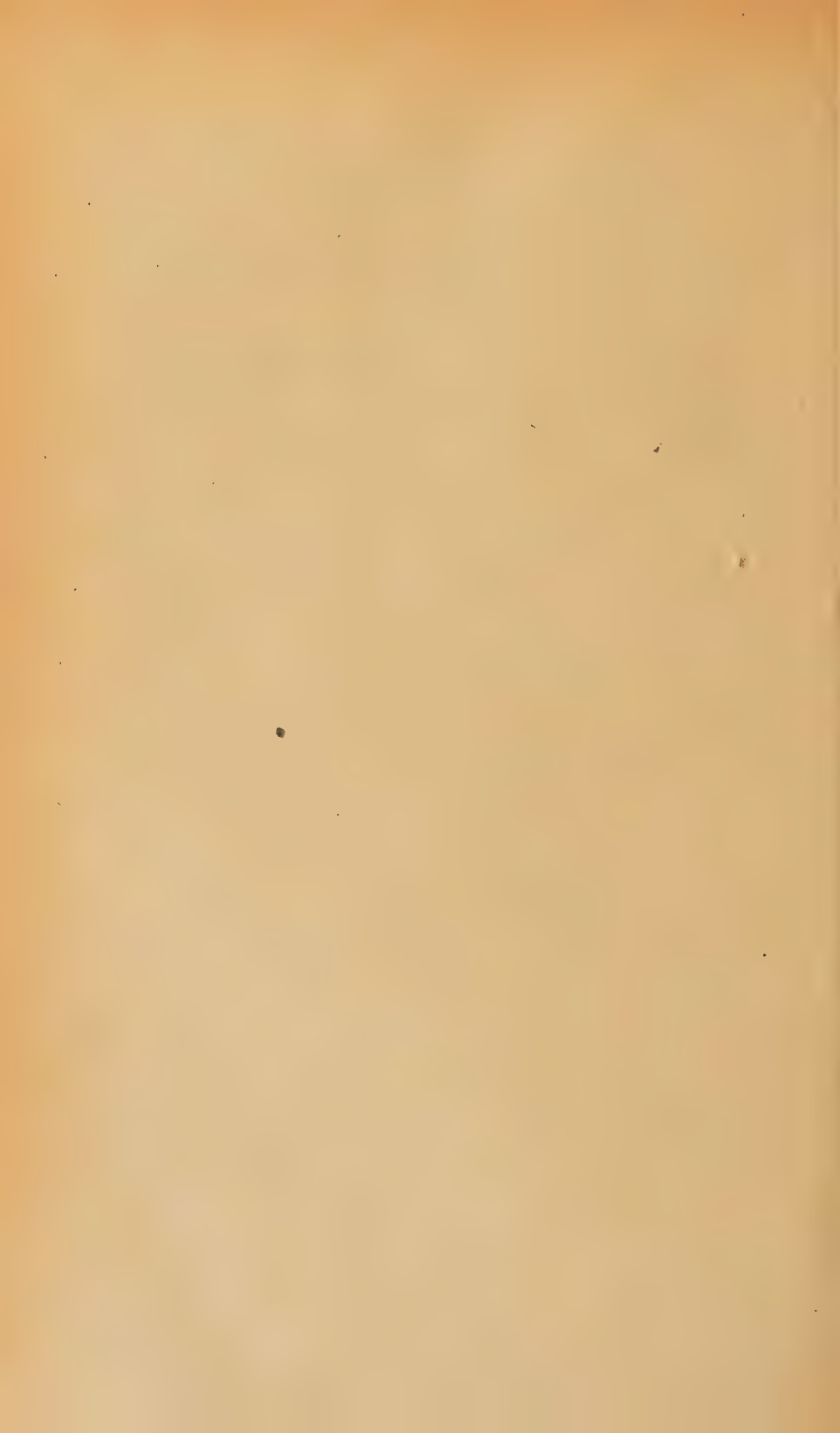
Marcel Labbé a signalé la présence de méthémoglobine dans le sang des malades atteints de formes graves de septicémie diphtérique. Enfin, plusieurs fois les auteurs ont attiré l'attention sur la présence de méthémoglobine dans le sang au cours d'accès palustres ; on aurait même observé *de la méthémoglobinurie*. Ces faits malgré tout demeurent vagues et plus de desiderata que d'acquis existe pour ce qui est de la part à attribuer à la méthémoglobine dans la pathologie ou la symptomatologie des maladies infectieuses. Marcel Labbé trouve l'explication de cette déficience du fait que les recherches de la méthémoglobine sont imprécises faute d'une technique de dosage pratique et qu'elles restent délicates à cause de la faible quantité de méthémoglobine qui peut exister dans le sang. L'auteur pense néanmoins que ces recherches mériteraient d'être reprises avec

une technique plus perfectionnée tout en étant plus simple.

Le dosage de la méthémoglobine dans le sang par la méthode spectrométrique semble répondre entièrement à ce désir.

Cette méthode de dosage peut être utilisée en médecine légale en vue de recherches toxicologiques, néanmoins, l'intérêt qu'elle offre dans cette branche de la Médecine nous semble quelque peu restreint.

En effet, dans le milieu, essentiellement réducteur qu'est le cadavre en voie de putréfaction, la méthémoglobine est rapidement réduite en hémoglobine. C'est avec juste raison que Otto, Nicloux et divers auteurs déclarent que la putréfaction fait disparaître la méthémoglobine dans le sang. Non seulement, dirons-nous, il ne se forme jamais de méthémoglobine dans le sang du cadavre, mais la méthémoglobine qui peut exister avant la mort disparaît dès le début de la putréfaction. Donc si la recherche de la méthémoglobine dans le sang peut avoir une valeur médico-légale, celle-ci diminue à mesure que l'examen est fait plus tardivement après la mort. Nous pensons, en effet, malgré l'opinion de certains auteurs sur ce point, que dans le sang du cadavre en voie de putréfaction, *on ne trouve jamais de méthémoglobine.*



Conclusions

1° L'oxyhémoglobine se transforme en méthémoglobine sous l'action des produits chimiques les plus divers et même d'une façon spontanée, si le sang est mis à l'abri de la putréfaction. Il est impossible de conserver de l'oxyhémoglobine en solution sans qu'il se forme de la méthémoglobine.

2° Le procédé le plus commode pour la préparation de la méthémoglobine est celui de Nicloux, qui consiste à conserver le sang à l'abri de la putréfaction par l'addition d'alcool.

3° La méthémoglobine contient moitié moins d'oxygène que l'oxyhémoglobine. En présence des réducteurs, elle se transforme en hémoglobine ; mais si l'action des réducteurs est modérée, l'hémoglobine se combinant aussitôt à l'oxygène dissous ou à l'oxygène de l'air, il se forme de l'oxyhémoglobine. Si bien que l'on assiste à ce phénomène paradoxal : toute réduction de la méthémoglobine amène ce pigment à l'état d'oxyhémoglobine, c'est-à-dire à un degré d'oxydation supérieure.

4° Malgré l'opinion de divers auteurs, la méthémoglobine n'est pas plus stable que l'oxyhémoglo-

bine, sauf à l'égard du vide. Elle est même beaucoup plus sensible que l'oxyhémoglobine à l'action des réducteurs, ce qui semble indiquer *a priori* qu'elle doit se détruire facilement dans l'organisme.

5° Le maximum d'intensité pour la bande de gauche de la méthémoglobine acide ou neutre correspond à la longueur d'onde 633, pour la méthémoglobine alcaline à 601, pour la méthémoglobine fluorée à 507.

6° La méthémoglobine ne se combine pas avec l'oxyde de carbone.

7° Il existe deux bons procédés de dosage de la méthémoglobine dans le sang :

a) Procédé chimique de Nicloux et Fontès.

b) Procédé physico-chimique de Balthazard et Philippe.

Ce dernier est plus commode et plus rapide et n'exige *qu'une seule goutte de sang*. C'est un microdosage, donnant des erreurs inférieures à cinq pour cent ; à ce titre, il est susceptible d'applications en clinique et en toxicologie, pour l'étude de l'action méthémoglobinisante des médicaments, des agents infectieux et des poisons.

8° Nous avons provoqué expérimentalement l'apparition de quantités importantes de méthémoglobine dans le sang des animaux, surtout du chien, par exemple par l'ingestion d'acétanilide. On atteint une teneur de 60 % de méthémoglobine sans provo-

quer la mort de l'animal, qui se rétablit ensuite très rapidement, en même temps que disparaît la méthémoglobine. L'acétanilide semble donc déterminer *uniquement*, comme l'a indiqué Pouchet, *une saignée virtuelle et temporaire*.

9° La première indication thérapeutique, en présence d'une intoxication par poison méthémoglobïnisant, consiste donc comme en cas d'intoxication oxycarbonée, dans les inhalations d'oxygène. La saignée est inutile sinon nuisible.

Vu, le Doyen,

ROGER.

Vu, le Président,

V. BALTHAZARD.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

LAPIE.

Bibliographie

- HOPPE-SEYLER. — *Centralb. f. d. Med. Wissensuch*, n° 53, 1864.
- A. GAMGEE. — *Proceedings of the royal Society of Edimburgh*, t. VI, p. 109, 1866-1867.
- HOPPE-SEYLER. — *Med. Chem. Untersuch. Berlin*, p. 378, 1868.
- PREYER. — *Pfüger's Archiv*, t. I, p. 395, 1868.
- WEYL et ANREP. — *Maly's Jahresb.*, t. X, p. 165, 1880.
- HÜFNER et OTTO. — *Zeitschr. f. phys. Chem.*, t. VII, p. 65, 1882.
- JADERHOLM. — *Studien über Methäemoglobin*. — *Zeitschrift. f. Biologie*, Bd. 20, pp. 419-448, 1884.
- VON MERING. — *Das chlorsaure Kali*, Berlin, 1885.
- H. BERTIN-SANS. — *Etudes sur la méthémoglobine*. — Thèse Montpellier, 1887-1888.
- HAYEM. — *Traité du sang*, Paris, 1889.
- DITTRICH. — *Ueber Methäemoglobin bildende gifte*. — *Archiv. f. exp. Path. u. Pharmacol.*, 29, pp. 250, 256, 258, 1891.
- H. BERTIN-SANS et MOITESSIER. — *Bul. Soc. Chim.*, 3, t. VI, p. 259, 1891.
- A. VON VORKAMPEFF-LAUE. — *Inaug. Dissert. Med. Dorpat*, 1892.
- SCHMIDT. — *Revue Médicale de l'Est*, 1892.
- D. PAGE. — *Méthémoglobinuria parosistica da malaria*. — *Giorn. internat. de Scienz. Med. Gen.*, 1894.
- MENZIES. — *On the methaemoglobin*. — *Journ. of Phys.*, 17, pp. 402-410 et planche IX, figure 8, 1895.

- LAMBLING. — Encyclopédie chimique de Frémy. — Chimie physiologique, 2^e fascicule, 3^e partie, pp. 64-76, 1895.
- J. HALDANE. — *Journ. of. Physiol.*, 22, p. 298, 301, 302, 1898.
- P. MASOIN. — *Archiv. internat. de Pharmacodynamie*, n^o 5, page 307, 1898.
- HÜFNER. — Neue Beobachtungen und Versuche über das Methämoglobin und seine Bildungsweise. Engel. — *Archiv. f. Physiologie*, pp. 467, 490, 491, 495, 1899.
- LAPICQUE et VAST. — *Soc. Biol.*, 51, pp. 369, 370, 1899.
- DENNIRIG. — Ueber die Einwirkung einiger vielgebrachten Arzneimittel auf die Methämoglobinbildung in Blute. — *Deutsch. Arch. f. Klin. Med.*, 65, pp. 524-541, 1900.
- LAMBLING. — Dictionnaire de Würtz, 43^e fascicule, pp. 63-70, 1902.
- M. LABBÉ. — *Archiv. de Méd. Exp.*, 15, p. 377, 1903.
- BLUMENTHAL. — Pathologie des Harnes am Krankenbett. — Berlin, p. 337, 1903.
- POUCHET. — Leçon de Pharmacodynamie et de mat. médicale, 4^e série, Passim, 1904.
- BEZANÇON et LABBÉ. — Traité d'hématologie, Paris, 1904.
- PIETTRE et VILA. — C. R. 140, 39, 6 février 1905.
- VILLE et DERRIEN. — C. R. 140, 743 et 1549, 13 mars et 5 juin 1905.
- Société impériale et royale des médecins de Vienne, 24 novembre 1905. — Intoxication mortelle avec méthémoglobinémie par le chlorate de potasse chez un enfant de 3 ans. — *Presse Médicale* du 9 décembre 1905.
- E. DERRIEN. — Sur la méthémoglobine. — Thèse de Montpellier, 1906.
- R. BENSAUDE et AGASSE-LAFONT. — Les intoxications par le sous-nitrate de bismuth administré à l'intérieur. — *Société Médicale des Hôpitaux*, 22 janvier 1909.

- W. C. STADIE. — A Method for the determination of methaemoglobin and Haemoglobin in Blood. — *Journ. of Biological Chemistry*, t. XLII, pp. 237-341, 1920.
- W. S. MC. ELLEROY. — A method for the determination of Methaemoglobin and Haemoglobin in Blood. — *Journ. of biological Chemistry*, t. XLII, pp. 297-300, 1920.
- D. D. VAN SLYKE AND W. C. STADIE. — The determination of the gases of the blood. — *Journ. of biological Chemistry*, t. XLIX, pp. 1, 42, 1921.
- H. E. ROAF et W. SMART. — The relation of methaemoglobin to oxyhaemoglobin. — *Journ. of physiol.*, t. LVI, Proc. 2, 1922.
- M. NICLOUX. — Sur le dosage de l'oxyde de carbone dans l'air. — *Bul. Soc. Chimie Biologique*, 1923.
- BALTHAZARD. — Détermination spectrométrique du coefficient d'empoisonnement dans l'intoxication oxycarbonée. — *Annales de médecine légale*, juin, et *Bul. de la Société de* 1924. — *Chimie Biologique*, novembre 1924.
- M. NICLOUX et G. FONTÈS. — Sur quelques modes de préparation de la méthémoglobine et sur son dosage en présence ou non d'oxyhémoglobine. — *Bul. Soc. chimie Biologique*, T. VI, pp. 719-741, septembre-octobre 1924.
- BALTHAZARD et PHILIPPE. — Dosage spectrométrique de la méthémoglobine dans le sang. — 10^e Congrès de Médecine légale de langue française, Lille, 25, 26, 27 mai 1925.
- NICLOUX et ROCHE. — *C. R. de l'Académie des Sciences*, p. 1968, 22 juin 1925.
- BALTHAZARD et PHILIPPE. — *Compte rendu Soc. de Biologie*, p. 398, 11 juillet 1925.
-

MP. COMMERCIAL PEARLETTE, LIMOGES